

The role of human papillomavirus in the development of tonsillar squamous cell carcinomas

Citation for published version (APA):

Hafkamp, H. C. (2009). *The role of human papillomavirus in the development of tonsillar squamous cell carcinomas*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University.
<https://doi.org/10.26481/dis.20090206hh>

Document status and date:

Published: 01/01/2009

DOI:

[10.26481/dis.20090206hh](https://doi.org/10.26481/dis.20090206hh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

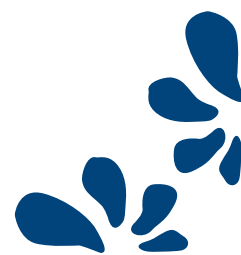
Download date: 04 May. 2023



Chapter 7



Summary



Chapter 1 reviews epidemiological aspects and risk factors of head and neck cancer. Head and neck cancer represents 6,5% of all annual cancer cases worldwide. This incidence is increasing in Western Europe and the US during the last decades. Besides the well known risk factors such as smoking, extensive alcohol use and betel quid chewing it has become clear that also oncogenic human papilloma viruses (HPVs) may play a role in the carcinogenesis of head and neck cancer. An overview of the HPVs is provided as well as an overview of the oncogenes that are expressed when the viral DNA is integrated in the host cell genome.

The overall aim of this thesis was to obtain more insight into the role of HPVs in the tumorigenesis of head and neck cancer, and into the clinical effects of HPV infection.

Oncogenic HPVs cause cancer by inactivation of the cell cycle regulators p53 and pRb by expression of viral oncoproteins E6 and E7. This means that p53 mutations are not a prerequisite in HPV-induced tumor development. However, a discrepancy existed in the literature with respect to the percentage of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) harboring oncogenic HPV and the fraction of these tumors showing p53 mutations. The different results may be due to the detection method used, the anatomic location of tumors, the type of HPV detected and/or the number of tissue samples analyzed in the various studies. Because HNSCC are thought to arise via a multistep process with histologically distinct precursor phenotypes the relationship between the presence of HPV16/18 and p53 alterations in premalignant lesions of the head and neck mucosa, HNSCC and their metastases was examined. This study is presented in **Chapter 2**. For the detection of HPV the fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol, combined with tyramide signal amplification was applied to paraffin-embedded tissue sections. Clinical data, as well as alcohol and tobacco intake were related to the presence of HPV in the tumors. It was found that HPV 16/18 DNA could not be detected in the premalignant lesions. Ten of the 47 HNSCC exhibited HPV 16-specific FISH signals and only in one case a simultaneous infection with HPV 18 was observed. Of these 10 HPV positive HNSCC, 9 were derived from the oropharynx, indicating a highly significant correlation between HPV positivity and localization in the oropharynx and especially in the tonsils. From the patients of which lymph node metastases were available for analysis, both the metastasis as well as the primary tumor displayed identical punctate nuclear HPV FISH signals, indicating stable integration of the virus prior to and during tumor

metastasis. Interestingly, 64% of the HNSCC showed accumulation of p53, including 8 of the 10 HPV positive carcinomas. In the HPV positive carcinomas with p53 overexpression, p53 mutations in exon 5-8 could not be detected, suggesting an overexpression of the wild-type p53. This study also showed a significant correlation between on the one hand low or absent exposure to tobacco and alcohol and HPV integration on the other.

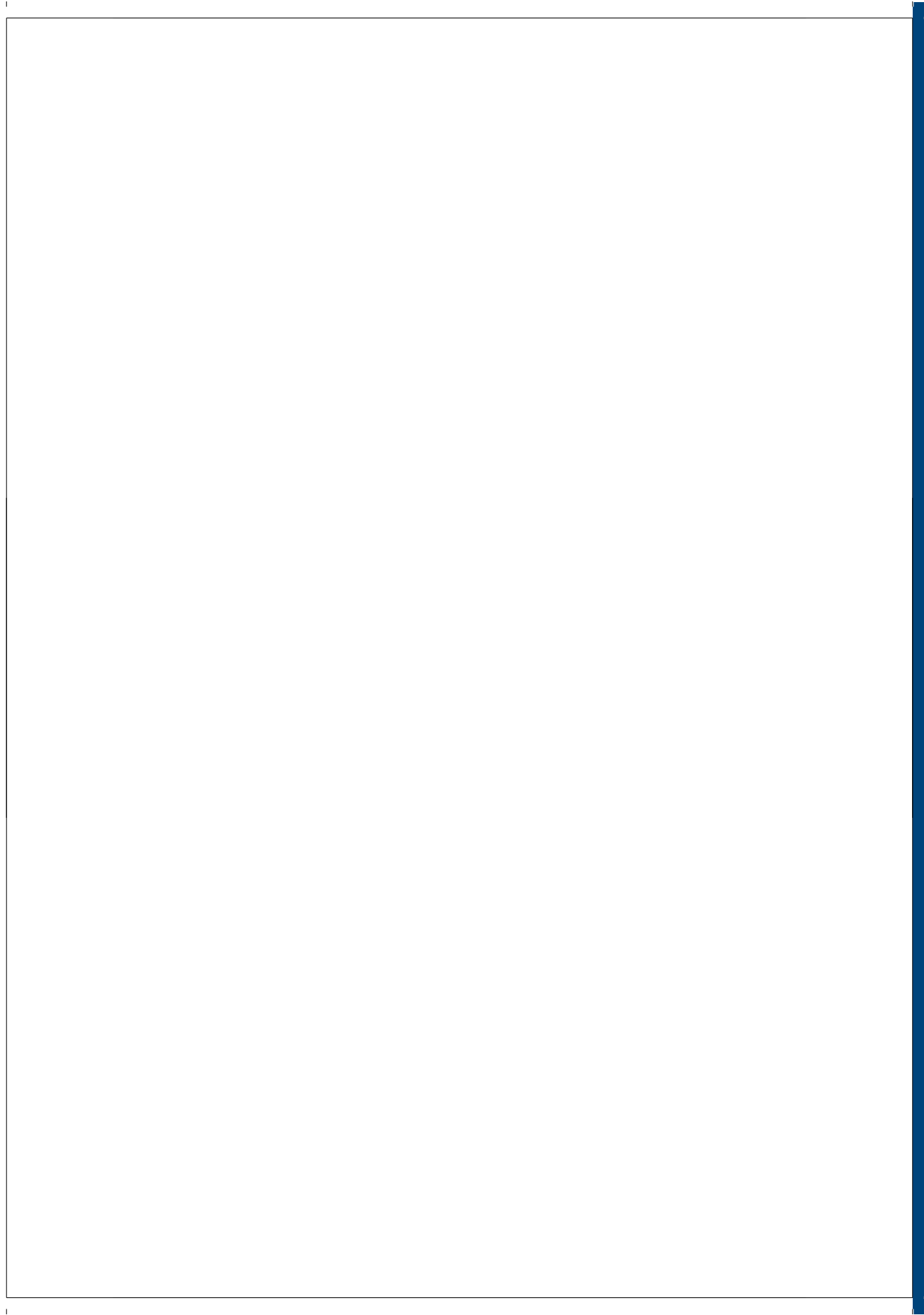
Since it became known that oncogenic HPVs are of importance in the pathogenesis of HNSCC and especially oropharyngeal carcinomas, 81 tonsillar squamous cell carcinomas (TSCC) were examined for the presence of HPV 16, as described in **Chapter 3**. Integration of oncogenic HPV DNA into the human cellular genome is considered an important step in malignant transformation. After integration and disruption of (part of) the viral E2 gene, an upregulation of the oncoproteins E6 and E7 is detected. The HPV E6 protein can interact with the cellular wild-type p53 tumor suppressor protein, inducing p53 degradation via the ubiquitin-mediated pathway. The E7 protein inactivates pRb, resulting in release of the transcription factor E2F and upregulation of p14^{ARF} and p16^{INK4A}. With respect to viral integration in oropharyngeal cancers however, the literature is controversial. In this study we used the FISH method for the detection of HPV 16. This technique allows the visualization of 1 copy of HPV DNA in tumor cells and at the same time the determination of the physical status (integrated versus episomal) of the virus on basis of the nuclear staining pattern. Furthermore, it was examined if p16^{INK4A} overexpression as detected by immunohistochemistry correlates with HPV 16 positivity, in order to investigate whether or not this method can reliably distinguish between HPV-positive and HPV-negative TSCC. The results were correlated to clinical and demographic data. HPV 16 DNA integration was detected in 41% of the TSCC. All but one of the 33 HPV-positive tumors, and only 5 out of 48 HPV-negative tumors showed overexpression of p16^{INK4A}. This implicates that p16^{INK4A} overexpression may be considered a reliable HPV biomarker. The presence of HPV furthermore correlated significantly with low tobacco and alcohol intake, poor differentiation grade, small tumor size, presence of a local metastases and a decreased (loco) regional recurrence rate. Statistical analysis showed that patients with HPV- positive tumors had a statistically better overall and disease specific survival rate. The 5 years disease-specific survival for patients with HPV-positive and HPV-negative carcinomas was 55% and 29%, respectively. Apart from absence of HPV 16, also lack

of p16^{INK4A} overexpression, smoking, a combination of smoking and alcohol abuse, a tumor diameter of > 4 cm and development of recurrent disease were associated with a shorter disease-specific survival in patients with TSCC. Multivariate analysis of all data, however, revealed that tobacco smoking was the strongest prognostic indicator. Smokers had a 5.5 times higher chance of cancer death compared to non-smokers, and patients with HPV-negative TSCCs were found to exhibit a 2 times higher chance of cancer death compared to patients with HPV-positive tumors. These data indicate that oncogenic processes in the tonsils of non-smokers differ from those in smokers, the former being related to HPV 16 infection.

Since p16^{INK4A} overexpression has been proposed as a potential biomarker for infection with HPV in squamous cell carcinomas it was investigated if p16^{INK4A} overexpression could also predict the presence of HPV in tumor-free tonsillar tissue. For this purpose paraffin-embedded tumor-free tonsils of 262 patients were tested for p16^{INK4A} overexpression by immunohistochemistry and HPV presence was tested by HPV-specific PCR analysis and FISH. In **Chapter 4** a detailed prescription of this study is given. P16^{INK4A} overexpression was found in 28% of the tissue samples, whereas HPV DNA could not be detected by PCR and FISH analysis. Therefore it is concluded that p16^{INK4A} overexpression is not a suitable marker to predict the presence of HPV in tumor-free tonsils. Other mechanisms than HPV infection seem therefore also to be implicated in upregulation of p16^{INK4A}.

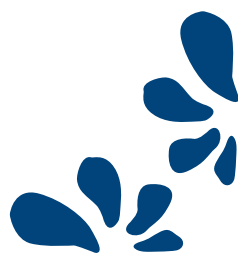
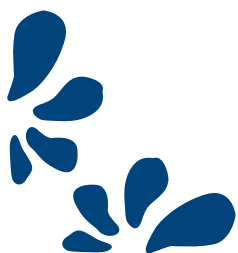
In **Chapter 5** the expression of key cell cycle proteins in the pRb and p53 pathways was examined in a series of 77 TSCC, with the goal to determine their role in HPV-dependent and HPV-independent carcinogenesis. Furthermore, their prognostic value was evaluated by correlating the results with clinical follow-up data. It was shown that HPV16-positive tumors exhibit p14^{ARF} and p21^{Cip1/WAF1} overexpression, next to downregulation of pRb and cyclin D1, which was not found in HPV16-negative tumors. Statistical analysis revealed a favorable survival rate for non-smokers, as well as for patients with T1-2 tumors or tumors showing low expression of cyclin D1, presence of HPV and overexpression of p16^{INK4A}, p14^{ARF} or p21^{Cip1/WAF1}. In multivariate regression analyses smoking and tumor size, as well as expression of cyclin D1 and p21^{Cip1/WAF1} were found to be independent prognostic markers. In particular p21^{Cip1/WAF1} overexpression appeared to be the strongest indicator for a favorable outcome in patients with TSCC.

Finally, in **Chapter 6** an overall discussion of the results is presented and findings are related to the recent literature. On basis of the results described in this thesis a diagnostic sequence for routine practice is suggested and treatment protocols are proposed.





Samenvatting



In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de epidemiologische aspecten van hoofd- halskanker en tevens wordt ingegaan op de risicofactoren die kunnen leiden tot het ontstaan van hoofd-halskanker. Hoofd-halskanker vertegenwoordigt 6,5% van alle nieuwe kankergevallen wereldwijd. Deze incidentie neemt de laatste jaren toe in West Europa en de Verenigde Staten. Naast de bekende risicofactoren zoals roken, overmatig alcoholgebruik en het kauwen van betelnoten is het duidelijk geworden dat ook oncogene humaan papilloma virussen (HPVs) een rol kunnen spelen bij het ontstaan van hoofd-halskanker. Er wordt een overzicht gegeven van het HPV, evenals van de oncogenen die tot expressie kunnen komen wanneer het virale DNA in het genoom van de gastheer integreert. Het doel van dit promotie-onderzoek was meer inzicht te verkrijgen in de rol die het HPV speelt bij het tot stand komen van hoofd-halskanker.

De oncogene HPVs veroorzaken kanker ten gevolge van inactivatie van de celcyclus regulerende eiwitten p53 en pRb door middel van de virale oncogene eiwitten E6 en E7. Dit betekent dat p53 mutaties niet noodzakelijk zijn bij HPV-geïnduceerde tumorontwikkeling. Met betrekking tot het percentage hoofd-halstumoren dat oncogeen HPV bevat en tegelijk mutaties heeft in het p53 eiwit bestaat echter onduidelijkheid in de literatuur. Deze onduidelijkheid wordt mogelijk veroorzaakt door het gebruik van verschillende detectie methoden, de anatomische locatie van de tumor, het type HPV en/of het aantal tumoren dat onderzocht werd in de verschillende onderzoeken. Aangezien de ontwikkeling van hoofd-halstumoren verloopt via meerdere stappen met histologisch te onderscheiden voorloper stadia werd getracht de relatie tussen de aanwezigheid van HPV type 16 en 18 enerzijds en p53 veranderingen anderzijds in voorloperleasies van de hoofd-hals mucosa, in hoofd- halscarcinomen en in hun metastasen vast te stellen. Dit onderzoek wordt beschreven in **Hoofdstuk 2**. Voor de detectie van HPV in paraffine coupes werd de fluorescente in situ hybridisatie (FISH) techniek gecombineerd met tyramide signaal versterking. De aanwezigheid van HPV in de tumoren werd gecorreleerd aan klinische gegevens en gegevens over het drink- en rookgedrag. In de premaligne laesies die werden onderzocht kon geen HPV 16/18 DNA gedetecteerd worden. In 10 van de 47 hoofd-halscarcinomen werd een HPV 16 specifiek FISH signaal gevonden en slechts in één geval werd tegelijkertijd een infectie met HPV 18 waargenomen. Van deze 10 HPV-positieve hoofd-halscarcinomen bleken er 9 afkomstig uit de oropharynx, hetgeen betekent dat er een duidelijk significante correlatie is tussen

HPV positiviteit en lokalisatie in de oropharynx en met name in de tonsillen. Bij de patiënten waarbij zowel de primaire tumor en de lymfeklier-metastase werd onderzocht, bleek dat zowel de tumor als de metastase hetzelfde nucleaire HPV-signaal toonden. Dit betekent dat het virus stabiel in het genoom is geïntegreerd alvorens de tumor zich verspreidt. In 64% van de hoofd- halscarcinomen, waaronder 8 van de 10 HPV-positieve carcinomen, werd een stapeling van p53 gevonden. In de HPV-positieve carcinomen met p53 overexpressie werden geen mutaties gevonden in exon 5-8 van p53, hetgeen suggereert dat er een overexpressie is van het wild-type p53. Gegevens uit dit onderzoek toonden eveneens een significante correlatie tussen HPV-integratie en een beperkt gebruik van alcohol en tabak.

Aangezien de oncogene HPVs een rol spelen bij het ontstaan van hoofd-halscarcinomen, met name in oropharyngeale carcinomen, werden 81 tonsilcarcinomen onderzocht op de aanwezigheid van HPV16. Dit onderzoek wordt beschreven in **Hoofdstuk 3**. Integratie van het oncogene HPV DNA in het menselijke cellulaire genoom wordt als een belangrijke stap in de maligne transformatie beschouwd. Na integratie en verstoring van (een gedeelte van) het virale E2 eiwit wordt er een verhoogde hoeveelheid van de oncogene eiwitten E6 en E7 gedetecteerd. Het HPV E6 eiwit kan een verbinding aangaan met p53, waardoor dit eiwit wordt afgebroken. Het E7 eiwit inactieveert het pRb, waardoor de transcriptie-factor E2F vrijkomt en er een verhoogde expressie van p14^{ARF} en p16^{INK4A} wordt gezien. Met betrekking tot de virale integratie bij oropharyngeale carcinomen bestaan tegenstrijdige berichten in de literatuur. In deze studie is de FISH-methode gebruikt voor het aantonen van HPV 16. Deze techniek maakt het mogelijk om slechts 1 kopie van het HPV DNA in de tumorcellen in beeld te brengen en tegelijkertijd is het mogelijk om te bepalen wat de fysieke toestand van het virus is (geïntegreerd ten opzichte van episomaal), dit op basis van het kleuringspatroon in de celkernen. Daarnaast werd onderzocht of p16^{INK4A} overexpressie, zoals aangetoond met behulp van immunocytochemie, correleert met HPV 16 positiviteit, met als doel te onderzoeken of deze detectiemethode betrouwbaar is om een onderscheid te maken tussen HPV-positieve en HPV-negatieve tonsilcarcinomen. De resultaten werden gecorreleerd aan klinische en epidemiologische gegevens. HPV 16 integratie werd gedetecteerd in 41% van de tonsilcarcinomen. Alle behalve één van de 33 HPV-positieve tumoren en slechts 5 van de 48 HPV-negatieve tumoren toonden overexpressie van p16^{INK4A}. Dit impliceert dat p16^{INK4A} overexpressie gezien kan worden als een betrouwbare

biomarker voor de aanwezigheid van HPV. Deze aanwezigheid van HPV correleerde verder significant met een laag alcohol- en tabakgebruik, een slechtere differentiatie, kleinere tumor diameter, de aanwezigheid van locale metastasen en een verlaagde kans op terugkeer van de tumoren. Statistische analyse van de gegevens toonde aan dat patiënten met HPV-positieve tumoren een betere ziekte-specifieke en totale overlevingskans hebben. De 5-jaars ziekte-specifieke overleving voor patiënten met HPV-positieve en HPV-negatieve carcinomen bedroeg respectievelijk 55% en 29%. Naast afwezigheid van HPV 16 bleek ook afwezigheid van p16^{INK4A} overexpressie, roken, een combinatie van roken en alcohol gebruik, een tumor diameter van meer dan 4 cm en de ontwikkeling van terugkerende ziekte geassocieerd met een kortere ziekte-specifieke overleving bij patiënten met tonsilcarinomen. Multivariantie analyse van alle gegevens toonde echter aan dat roken de belangrijkste prognostische factor was. Rokers hadden een 5,5 keer grotere kans om aan kanker te overlijden dan niet-rokers. Patiënten met HPV-negatieve tonsilcarinomen bleken 2 keer zoveel kans te hebben om aan kanker te overlijden dan patiënten met HPV-positieve tonsiltumoren. Deze gegevens tonen aan dat de oncogene processen in de tonsil bij niet-rokers verschillen van het proces bij rokers, waarbij het proces bij de niet-rokers gecorreleerd is aan HPV 16 infecties.

Aangezien p16^{INK4A} overexpressie gezien kon worden als marker voor de aanwezigheid van HPV in carcinomen, werd onderzocht of p16^{INK4A} overexpressie ook de aanwezigheid van HPV in tumorvrij tonsilweefsel kon voorspellen. Met dit doel werden tumorvrije tonsillen onderzocht van 262 patiënten. De aanwezigheid van p16^{INK4A} overexpressie werd bekeken met behulp van immunocytochemie. De aanwezigheid van HPV werd getest met behulp van HPV-specifieke PCR analyse en FISH. In **Hoofdstuk 4** wordt een gedetailleerde beschrijving van deze studie gegeven. P16^{INK4A} overexpressie werd gevonden in 28% van de tumorvrije tonsillen en HPV kon met behulp van PCR analyse worden aangetoond in 2 tonsillen, terwijl FISH deze aanwezigheid van HPV niet kon bevestigen. Uit deze gegevens werd dan ook geconcludeerd dat p16^{INK4A} overexpressie geen betrouwbare marker is om de aanwezigheid van HPV te voorspellen in tumorvrije tonsillen. Andere mechanismen dan HPV infecties moeten daarom verantwoordelijk zijn voor deze p16^{INK4A} overexpressie.

In **Hoofdstuk 5** wordt het onderzoek beschreven naar de expressie van verschillende celcyclus-eiwitten in de pRB- en p53-routes van een serie van 77 tonsilcarinomen.

Met dit onderzoek werd bepaald wat de rol is van de verschillende eiwitten in de HPV-onafhankelijke en HPV-afhankelijke ontwikkeling van carcinomen. Daarnaast werd de prognostische waarde van de verschillende eiwitten bepaald door de resultaten te correleren met de klinische gegevens. De HPV-16 positieve tumoren toonden een overexpressie van p14^{ARF} en p21^{Cip1/WAF1} en een verlaagde expressie van pRb en cycline D1, dit in tegenstelling tot HPV-16 negatieve tumoren. Statistische analyse toonde een betere overlevingskans voor niet-rokers en voor patiënten met T1-2 tumoren of tumoren met een lage expressie van cycline D1, de aanwezigheid van HPV en overexpressie van p^{16INK4A}, p14^{ARF} of p21^{Cip1/WAF1}. Multivariate analyse toonde dat roken, tumor grootte, expressie van cycline D1 en p21^{Cip1/WAF1} onafhankelijke prognostische factoren zijn. Met name p21^{Cip1/WAF1} overexpressie bleek de belangrijkste voorspeller van een gunstige prognose bij patiënten met tonsilcarinomen.

In **Hoofdstuk 6** worden tenslotte in een algehele discussie onze bevindingen gerelateerd aan tegenwoordige kennis uit de literatuur. Er wordt een diagnostisch protocol voorgesteld dat toegepast zou moeten worden in het routine onderzoek. Tevens worden verschillende behandel mogelijkheden beschreven. Daarnaast wordt aangegeven welke richting het toekomstig onderzoek in de komende jaren zou kunnen inslaan.